



IPW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: **YANAGISAWA, Katsuhiko, et al.**

Group Art Unit: 1646

Serial No.: 10/768,193

Examiner: Not Yet Assigned

Filed: February 2, 2004

P.T.O. Confirmation No.: 3691

For. **ANTIBODY RECOGNIZING GM1 GANGLIOSIDE-BOUND AMYLOID
β-PROTEIN AND DNA ENCODING THE ANTIBODY**

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Date: May 14, 2004

Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

Japanese Appln. No. 2001-235700, filed August 3, 2001

Japanese Appln. No. PCT/JP02/07874, filed August 1, 2002

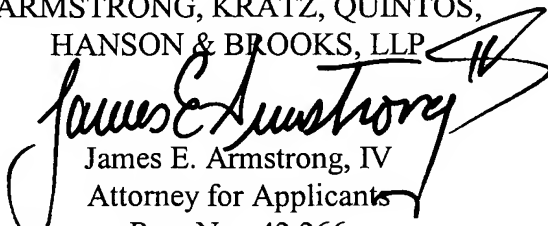
In support of this claim, the requisite certified copies of said original foreign applications are filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copies.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

Respectfully submitted,

ARMSTRONG, KRATZ, QUINTOS,
HANSON & BROOKS, LLP


James E. Armstrong, IV
Attorney for Applicants
Reg. No. 42,266

JAM/rmp
Atty. Docket No. 040036
1725 K Street, N.W., Suite 1000
Washington, D.C. 20006
(202) 659-2930



23850

PATENT TRADEMARK OFFICE

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 8 月 3 日
Date of Application:

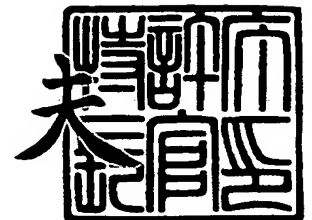
出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 2 3 5 7 0 0
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 1 - 2 3 5 7 0 0]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社医学生物学研究所
 国立療養所中部病院長
 柳澤 勝彦

2 0 0 4 年 2 月 1 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 8 4 2 6

【書類名】 特許願

【整理番号】 P01024

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県大府市森岡町源吾 3 6 - 3

 【氏名】 柳澤 勝彦

【発明者】

 【住所又は居所】 長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1 0 6 3 - 1 0 3 株
 式会社医学生物学研究所内

 【氏名】 柴田 昌夫

【特許出願人】

 【持分】 001/004

 【識別番号】 390004097

 【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【特許出願人】

 【持分】 001/002

 【住所又は居所】 愛知県大府市森岡町源吾 3 6 - 3

 【氏名又は名称】 国立療養所中部病院長

【特許出願人】

 【持分】 001/004

 【住所又は居所】 愛知県大府市森岡町源吾 3 6 - 3

 【氏名又は名称】 柳澤 勝彦

【代理人】

 【識別番号】 100095577

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 小西 富雅

【選任した代理人】

【識別番号】 100114362

【弁理士】

【氏名又は名称】 萩野 幹治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 045908

【納付金額】 10,500円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0005405

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識する抗体、及び該抗体をコードするDNA

【特許請求の範囲】

【請求項1】 重鎖可変領域がa)～c)の少なくとも一つの領域を有し、GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体、

a)配列番号：1に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第1領域、

b)配列番号：2に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第2領域、

c)配列番号：3に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第3領域。

【請求項2】 軽鎖可変領域がd)～e)の少なくとも一つの領域を有し、GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体、

d)配列番号：4に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第4領域、

e)配列番号：5に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第5領域、

f)配列番号：6に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第6領域。

【請求項3】 重鎖可変領域がg)～i)のCDRを有し、かつ軽鎖可変領域がj)～l)のCDRを有し、

GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体、

g)配列番号：1に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR1、

h)配列番号：2に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変

したアミノ酸配列からなるCDR2、

i)配列番号：3に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR3、

j)配列番号：4に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR1、

k)配列番号：5に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR2、

l)配列番号：6に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR3。

【請求項4】 重鎖可変領域が配列番号：7に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

【請求項5】 軽鎖可変領域が配列番号：8に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

【請求項6】 重鎖可変領域が配列番号：7に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

軽鎖可変領域が配列番号：8に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

【請求項7】 ヒト化抗体である、請求項1～6のいずれかに記載の抗体。

【請求項8】 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、又はdsFv抗体である、請求項1～7のいずれかに記載の抗体。

【請求項9】 請求項1～8のいずれかに記載の抗体をコードするDNA。

【請求項10】 請求項1、3、4、6、7、又は8に記載される抗体の重鎖可変領域をコードするDNA。

【請求項11】 配列番号：9の塩基配列からなる、請求項10に記載のDNA。
A。

【請求項12】 請求項10又は11に記載のDNAを含む、抗体重鎖をコードするDNA。

【請求項13】 請求項2、3、5、6、7、又は8に記載される抗体の軽鎖可変領域をコードするDNA。

【請求項14】 配列番号：10の塩基配列からなる、請求項13に記載のDNA。

【請求項15】 請求項13又は14に記載のDNAを含む、抗体軽鎖をコードするDNA。

【請求項16】 配列番号：1のアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項17】 配列番号：2のアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項18】 配列番号：3のアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項19】 配列番号：4のアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項20】 配列番号：5のアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項21】 配列番号：6のアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項22】 請求項9～21のいずれかに記載のDNAを発現可能に含有するベクター。

【請求項23】 請求項10～12のいずれかに記載のDNA、及び請求項13～15のいずれかに記載のDNAを発現可能に含有するベクター。

【請求項24】 請求項22又は23に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項25】 請求項10～12のいずれかに記載のDNAを発現可能に含有するベクター、及び請求項請求項13～15のいずれかに記載のDNAを発現可能に含有するベクターで共形質転換された形質転換体。

【請求項26】 請求項24又は25に記載の形質転換体を培養する工程、及び発現された抗体を回収する工程を含む、抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、抗体及びそれをコードする遺伝子に関する。詳しくは、アルツハイマー病に関連する抗体及びそれをコードする遺伝子に関する。

【0002】**【従来の技術】**

現在、日本はかつて無いスピードで人口の高齢化が進展しており、それと共に痴呆症患者の数も増えつつある。国立社会保障・人口問題研究所の調査によれば、痴呆症患者数は西暦2000年には165万人、2015年には264万人に及ぶと見積もられている。これら痴呆性疾患の患者の介護は経済的にも大きな負担となることから、一日も早い有効な治療法の開発が望まれている。

老人性痴呆症のうち、主要なものはアルツハイマー病（AD）であり、本疾患の病態生理の全体像は依然不明であるが、研究は急速に進展している。アルツハイマー病患者に共通してみられる特徴としては（1）脳の萎縮（2）老人斑と呼ばれる斑状の蓄積物の形成を認めること（3）神経細胞内に繊維状の物質が蓄積した神経原繊維変化、の3つがあり、この3つを認める場合にアルツハイマー病と診断される。しかし、（1）の脳の萎縮を除き老人斑の形成や神経原繊維の変化は外部からの観察によっては知ることができず、このことがアルツハイマー病の診断を困難なものにしている。従って、分子遺伝学的マーカーや生化学的マーカーなど、十分な特異性と感度を持った、アルツハイマー病の診断のための生物学的マーカーの開発が望まれている。

【0003】

アルツハイマー病の臨床症状である痴呆と密接に結びついているのが神経細胞の脱落であるが、神経細胞の脱落がどのような理由で起こるかについて、上記の病理変化が重要な手がかりを与える。1990年代後半からの研究の進展により、老人斑がアミロイド β タンパク（ $A\beta$ ）と呼ばれるペプチドが凝集して沈着したものであることが明らかになった。一方、神経原繊維変化は神経細胞の骨格タンパク質の一つであるtauタンパク質がリン酸化されて細胞内で凝集しているものであることが明らかにされた。

アルツハイマー病には遺伝的要因によって引き起こされる家族性アルツハイマ

ーと、遺伝的背景を持たない孤発性アルツハイマーが知られており、家族性アルツハイマーの原因遺伝子や危険因子が明らかにされつつある。家族性アルツハイマーの原因遺伝子の一つにアミロイド前駆体タンパク質 (Amyloid Precursor Protein ; APP) をコードする遺伝子があり、この遺伝子に突然変異があると必ずアルツハイマー病を引き起こすことが知られている。従って、これら変異体の作用、機能を見出せばアルツハイマー病の発症機構が明らかになると考えられる。家族性アルツハイマーと孤発性アルツハイマーの間には共通の機構が存在すると予測されるため、家族性アルツハイマー病の発症機構の研究から孤発性アルツハイマーの場合にも適用できる機構が浮かび上がってくると考えられる。

【0004】

$A\beta$ は APP から β 及び γ セクレターゼによって切り出されるが、 $A\beta$ には切断点の違いにより $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ が存在し、 $A\beta_{42}$ の方が $A\beta_{40}$ よりも凝集しやすいこと、また病理学的観察により $A\beta_{42}$ が最初に凝集し、この $A\beta_{42}$ を核として $A\beta_{40}$ が凝集して繊維形成が進むという説が提唱されている。最近の本発明者らの研究によれば、AD の脳において GM1 ガングリオシド (GM1) に結合することによって $A\beta$ の沈着が開始するとの知見が得られている (K. Yanagisawa, A. Odaka, N. Suzuki, Y. Ihara, Nat. Med. 1, 1062 (1995)、K. Yanagisawa, Y. Ihara, Neurobiol. Aging 19, S65 (1998))。また、本発明者らは、GM1 結合型 $A\beta$ を特異的に認識するモノクローナル抗体 (4396 抗体) の作製に成功したことを報告した (FEBS Letters 420, 43-46 (1997))。本発明者らは、GM1 結合型 $A\beta$ のユニークな分子特性に基づき、 $A\beta$ が GM1 への結合によって構造を変化させ、そしてアミロイド繊維形成の種 (シード) として働くという仮説を立てた。その後、複数の研究者が *in vitro* での研究を行い、この仮説を支持する結果、即ち、 $A\beta$ は膜上において GM1 に特異的に結合すること、GM1 を含有するリポソームの添加によって可溶性の $A\beta$ が凝集を開始しアミロイド繊維を形成することが示されている。(J. McLaurin, A. Chakrabartty, J. Biol. Chem. 271, 26482 (1996)、P. Choo-Smith, W. K. Surewicz, FEBS Lett. 402, 95 (1997)、P. Choo-Smith, W. Garzon-Rodriguez, C. G. Globe, W. K. Surewicz, J. Biol. Chem. 272, 22987 (1997)、K. Matsuzaki, C. Horikiri, Biochemistry 38, 4137 (1999)、V. Koppaka, P. H. Axel

sen, Biochemistry 39, 10011 (2000))。

【0005】

一方、GM1とA β とが複合体を形成する分子メカニズムについて、A β のGM1への結合が、結合する膜のコレステロールの濃度に依存していること、即ち、高濃度のコレステロールにより膜上のGM1「クラスター」の形成が促され、これによりA β とGM1との結合が促進されることが報告されている(A. Kakio, S. Nishimoto, K. Yanagisawa, Y. Kozutumi, K. Matsuzaki, J.Biol.Chem, 276, 24985(2001))。また、シナプス膜のexofacial leafletsにおけるコレステロール濃度は加齢及び/又はアポリポタンパク質E (Apo E) の欠乏とともに有意に増加することから(U. Igbavboa, N.A.Avdulov, F.Schroeder, W.G.Wood, J.Neurochem. 66, 1717 (1996)、U. Igbavboa, N.A.Avdulov, S.V.Chochina, W.G.Wood, J.Neurochem. 69, 1661 (1997))、A β は老化脳のシナプス膜においてGM1に結合することが推測された。一方、GM1及びコレステロールを豊富に含む膜ドメイン (raftsと呼ばれる) は生理的に多量のA β を含有し、かつある種の家族性アルツハイマー病モデルマウスにおいて不溶性A β を蓄積することから、A β はこの膜ドメイン (rafts) においてGM1に結合する可能性も推測された(R.G.Parton, J. Histochem. Cytochem. 42, 155(1994)、K.Simons, E.Ikonen, Nature 387, 569 (1997)、S.J.Lee et al., Nat. Med. 4, 730 (1998)、M. Morishima-Kawashima, Y.Ihara, Biochemistry 37, 15274 (1998)、N.Sawamura et al., J. Biol. Chem. 275, 27901 (2000))。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は以上の背景に鑑みなされたものであり、アルツハイマー病の治療、診断、又は予防に有効な手段を提供することを目的とし、具体的にはアルツハイマー病の治療等に有効な抗体及びこれをコードするDNA、並びに薬剤のスクリーニング方法、及び薬剤を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

まず、本発明者らはGM1結合型A β を認識する上記抗体 (4396抗体) のクラスを

同定した。その結果、抗体はIgMクラス、L鎖は λ 鎖であった。次に、H鎖（重鎖）及びL鎖（軽鎖）の可変領域をコードするDNAの配列を決定することを試み、これに成功した。H鎖及びL鎖についてCDRのDNA配列の同定も併せて行った。続いて、H鎖可変領域をコードするDNAを合成し、これにマウスIgG2a定常領域をコードするDNAをライゲーションした後、発現ベクターに組み込みH鎖発現ベクターを作製した。同様に、L鎖をコードするDNAを組み込んだベクター（L鎖発現ベクター）を作製した。これらのベクターをCHO細胞にトランスフェクトして得られた形質転換体の中で抗体産生能の高いものを選択し、その培養上清を回収、精製することにより、4396抗体の可変領域を有するIgG型抗体（以下、「4396C抗体」ともいう）を得ることに成功した。

【0008】

一方、4396C抗体の免疫学的特性を検討するとともに、当該抗体を用いてGM1によるアミロイド繊維形成開始の基礎にある分子機構を解明することを試みた。まず、GM1ガングリオシド（以下、略して「GM1」とも言う）、コレステロール、及びスフィンゴミエリンを含有させた、raftsと類似する脂質組成のリポソームを作製した。このリポソームを用い、4396C抗体がリポソーム中のGM1と結合したアミロイド β タンパク質（以下、略して「A β 」とも言う）を認識するか否かを検討したところ特異的な結合が認められた。そこで、上記リポソームの存在下におけるアミロイド繊維の形成が4396C抗体によって阻害されるか検討したところ、特異的かつ添加量依存的な阻害効果が認められた。他方、公知の他の抗A β 抗体を用いて同様の実験を行ったところアミロイド繊維の形成の阻害はみられなかった。また、この他の抗A β 抗体は新たに形成されたアミロイド繊維の端に結合することが示された。これらの結果は上記のシーディング仮説を支持するものであり、即ちGM1結合型A β （以下、略して「GM1-A β 」ともいう）はアミロイド繊維形成における種（シード）として機能していることを示すものであった。また、公知の抗A β 抗体とは異なり、4396C抗体はこのシードに対して特異的な結合をすることから、4396C抗体における可変領域の構造（即ち、4396抗体の可変領域の構造）、特にCDRの構造がアルツハイマー病の診断、治療等に利用できることが見出された。かかる知見から、4396C抗体の可変領域の構造、特にCDRの構造を有するヒ

ト化抗体を作製すれば、極めて有効なアルツハイマー症の診断、治療等が可能になると考えられた。

【0009】

本発明は以上の知見に基づき完成されたものであり、本発明の第1の局面は次の構成からなる。

[1] 重鎖可変領域がa)～c)の少なくとも一つの領域を有し、

GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体、

a)配列番号：1に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第1領域、

b)配列番号：2に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第2領域、

c)配列番号：3に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第3領域。

[2] 軽鎖可変領域がd)～e)の少なくとも一つの領域を有し、

GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体、

d)配列番号：4に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第4領域、

e)配列番号：5に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第5領域、

f)配列番号：6に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第6領域。

[3] 重鎖可変領域がg)～i)のCDRを有し、かつ軽鎖可変領域がj)～l)のCDRを有し、

GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体、

g)配列番号：1に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR1、

h) 配列番号：2に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR2、

i) 配列番号：3に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR3、

j) 配列番号：4に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR1、

k) 配列番号：5に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR2、

l) 配列番号：6に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR3。

[4] 重鎖可変領域が配列番号：7に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

[5] 軽鎖可変領域が配列番号：8に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

[6] 重鎖可変領域が配列番号：7に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

軽鎖可変領域が配列番号：8に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

GM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

[7] ヒト化抗体である、[1]～[6]のいずれかに記載の抗体。

[8] Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、又はdsFv抗体である、[1]～[7]のいずれかに記載の抗体。

【0010】

【発明の実施の形態】

本明細書において、アミノ酸配列の一部の改変とは、アミノ酸配列を構成する1～数個のアミノ酸の欠失、置換、若しくは1～数個のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変化が生ずることをいう。

【0011】

本発明の第1の局面は、GM1ガングリオシド (GM1) 結合型アミロイド β タンパク質 (A β) (GM1-A β) を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体に関する。

本発明における抗体には、マウス、ラットなどの非ヒト動物の抗体、一部の領域を他の動物 (ヒトを含む) のものに置換したキメラ抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体が含まれる。また、抗体のクラスも特に限定されないが、好ましくはIgGクラスの抗体である。例えば、ヒト抗体のサブクラスIgG1、IgG2、IgG3、IgG4に属する抗体である。

【0012】

可変領域には、マウス抗GM1-A β 抗体の可変領域を用いることができる。マウス抗GM1-A β 抗体としては、例えばアルツハイマー病患者の脳から精製されたGM1-A β を抗原としてマウスを免疫して得られたマウス抗GM1-A β 抗体 (例えば、論文 (K.Yanagisawa, J.McLaurin, M.Michikawa, A.Chakrabartty, Y.Ihara, FEBS Lett., 420, 43, (1997)) に記載される4396抗体) を用いることができる。

【0013】

重鎖可変領域については、配列番号：1に記載されるアミノ酸配列からなる第1領域、配列番号：2に記載されるアミノ酸配列からなる第2領域、又は配列番号：3に記載されるアミノ酸配列からなる第3領域のいずれか一つ以上の領域を含むことが好ましい。ここでの第1領域、第2領域、及び第3領域は、それぞれ4396抗体の重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3に相当する。より好ましくは、重鎖可変領域が第1領域～第3領域の全てを含んで構成される。さらに好ましくは、重鎖可変領域が第1領域をCDR1、第2領域をCDR2、第3領域をCDR3として含んで構成される。

【0014】

軽鎖可変領域については、配列番号：4に記載されるアミノ酸配列からなる第

4 領域、配列番号：5 に記載されるアミノ酸配列からなる第 5 領域、又は配列番号：6 に記載されるアミノ酸配列からなる第 6 領域のいずれか一つ以上の領域を含むことが好ましい。ここでの第 4 領域、第 5 領域、及び第 6 領域は、それぞれ 4396 抗体の軽鎖 CDR1、CDR2、及び CDR3 に相当する。より好ましくは、軽鎖可変領域が第 4 領域～第 6 領域の全てを含んで構成される。さらに好ましくは、重鎖可変領域が第 4 領域を CDR1、第 5 領域を CDR2、第 6 領域を CDR3 として含んで構成される。

【0015】

上記第 1 領域～第 6 領域のアミノ酸配列に代えて、各アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列をそれぞれ用いることもできる。但し、アミノ酸配列の改変は、本発明の抗体が GM1- $A\beta$ を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する範囲に限られる。当該活性を有する限りアミノ酸配列の改変により当該活性が上昇、又は減少してもよい。改変されるアミノ酸の数は、好ましくは全体の 30% 以下であり、更に好ましくは全体の 20% 以下であり、更に更に好ましくは全体の 10% 以下である。

【0016】

好ましい本発明の抗体の一例として、以下の構成のものを挙げることができる。重鎖可変領域が、g) 配列番号：1 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR1、h) 配列番号：2 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR2、及び i) 配列番号：3 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR3 を有し、

軽鎖可変領域が、j) 配列番号：4 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR1、k) 配列番号：5 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR2、及び l) 配列番号：6 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR3 を有する抗体である。当該抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列としては、それぞれ配列番号：7 及び配列番号：8 に記載されるものを例示することができる。この場合において、シグナル

部分を除いて構成されるアミノ酸配列を用いることもできる。尚、配列番号：7及び配列番号：8のアミノ酸配列は、それぞれ4396抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列に相当する。

【0017】

本発明の抗体にはヒト化抗体が含まれる。ここでのヒト化抗体とは、ヒトの抗体に構造が類似した抗体のことをいい、抗体の定常領域のみをヒト抗体のものに置換したヒト型キメラ抗体、及び定常領域及び可変領域に存在するCDR（相補性決定領域）以外の部分をヒト抗体のものに置換したヒト型CDR移植（CDR-grafted）抗体（P.T.Johns et al., Nature 321,522(1986)）を含む。

【0018】

ヒト型キメラ抗体は、例えば上記の重鎖可変領域の構造及び／又は軽鎖可変領域の構造を有する抗体（例えば、4396抗体を遺伝子工学的クラススイッチ技術（M.M.Bending, S.T.Jones, in Antibody Engineering, J.McMafferty, H.R.Hoogenboom and D.J.Chiswell Eds. (IRL Press, 1996), pp.147-165）により作製したIgGクラスのマウス抗GM1-A β 抗体（4396C抗体））の定常領域をヒト抗体の定常領域に置換することにより作製することができる。ヒト抗体の定常領域としては公知のものを採用することができる。

【0019】

以下に、ヒト型キメラ抗体の作製方法の一例を示す。

まず、マウス抗GM1-A β 抗体を産生するハイブリドーマよりmRNAを抽出し、常法に従ってcDNAを合成する。合成したcDNAをベクターに組み込みcDNAライブラリーを構築する。このcDNAライブラリーから、H鎖遺伝子フラグメント及びL鎖遺伝子フラグメントをプローブとして用いることにより、H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子を含有するベクターを選択する。選択されたベクターの挿入配列のシーケンシングを行うことにより、H鎖可変領域及びL鎖可変領域の遺伝子の配列が決定される。このようにして得られた配列データを基にH鎖可変領域をコードするDNAを化学合成、生化学的切断／再結合等により作製する。得られたH鎖可変領域をコードするDNAをヒトH鎖定常領域をコードするDNAとライゲーションして発現用ベクターに組込むことによりH鎖発現ベクターを作製する。発現ベクターとしては、例

例えばSV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV (パピローマウイルス) basedベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。一方、同様の方法によりL鎖発現ベクターを作製する。これらH鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としては、CHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣)(A.Wright & S.L.Morrison, J.Immunol.160, 3393-3402 (1998))、SP2/0細胞(マウスミエローマ)(K.Motmans et al., Eur.J.Cancer Prev.5, 512-519 (1996), R.P.Junghans et al., Cancer Res.50, 1495-1502 (1990))などが好適に用いられる。また、形質転換にはリポフェクティン法(R.W.Malone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 6077 (1989), P.L.Felgner et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 7413 (1987)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(F.L.Graham & A.J.van der Eb, Virology 52, 456-467 (1973))、DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。

【0020】

そして、この形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト型キメラ抗体が得られる。抗体は、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて分離、精製することができる。

【0021】

一方、ヒト型CDR移植抗体は、例えば以下の方法により作製することができる。

まず、上記キメラ抗体の製造方法の欄で述べた方法により、マウス抗GM1-A β 抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列を決定する。併せて各CDR領域のアミノ酸配列及び塩基配列を決定する。

具体的なCDRの塩基配列としては、例えば、H鎖のCDR1、CDR2、及びCDR3に配列番号：11、配列番号：12、及び配列番号：13に示されるものをそれぞれ用いることができ、L鎖のCDR1、CDR2、及びCDR3に配列番号：14、配列番号：15、及び配列番号：16に示されるものをそれぞれ用いることができる。

次に、CDR領域を挟んで存在するFR(フレームワーク領域)を選択する。FRの選択には、およそ三つの方法が採用できる。1つめの方法は、NEWM、REIなど既

に三次元構造の明らかとなったヒト抗体フレームを用いる方法である (Riechman n L. et al., Nature 332, 323-327 (1988); Tempst, PR. et al., Protein Engineering 7, 1501-1507 (1994); Ellis JH. et al., J. Immunol 155, 925-937 (1995))。2つめの方法は、データベースにより、目的のマウス抗体可変領域と最も高いホモロジーを持つヒト抗体可変領域を選択し、そのFRを用いる方法である (Queen C. et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); Rozak MJ. et al., J Biol Chem 271, 22611-22618 (1996); Shearman CW. et al., J. Immunol 147, 4366-4373 (1991))。3つめの方法は、ヒト抗体のFRで最も共通に用いられるアミノ酸を選択する方法である (Sato K. et al., Mol Immunol 31, 371-381 (1994); Kobinger F. et al., Protein Engineering 6, 971-980 (1993); Kettleborough CA. et al., Protein Engineering 4, 773-783 (1991))。本発明ではこれらいずれの方法を用いることもできる。

【0022】

尚、本発明においては、選択されたヒトFRのアミノ酸配列を改変したアミノ酸配列も、最終的に得られるヒト型CDR移植抗体がGM1-A β を認識し、アミロイド繊維の形成を制御する活性を有する範囲において、FRのアミノ酸配列として利用することができる。特に、選択されたヒトFRのアミノ酸の一部をCDRの由来となった抗体のFRのアミノ酸に変更した場合、抗体の特性が維持される可能性が高い。改変されるアミノ酸の数は、好ましくはFR全体の30%以下であり、更に好ましくはFR全体の20%以下であり、更に更に好ましくはFR全体の10%以下である。

【0023】

次に、これらいずれかの方法により選択したFRと上記CDRとを組み合わせることにより、H鎖可変領域及びL鎖可変領域をコードするDNAを設計する。この設計を基にH鎖可変領域をコードするDNAとL鎖可変領域をコードするDNAを化学合成、生化学的切断／再結合等によりそれぞれ作製する。そして、H鎖可変領域をコードするDNAをヒト免疫グロブリンH鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに組み込みH鎖発現ベクターを構築する。同様に、L鎖可変領域をコードするDNAをヒト免疫グロブリンL鎖定常領域をコードするDNAとともに発現ベクターに

組み込みL鎖発現ベクターを構築する。発現ベクターとしては、例えばSV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV（パピローマウイルス）basedベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。

【0024】

以上の方法で作製されたH鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としては、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣）（A.Wright & S.L.Morrison, J.Immunol.160, 3393-3402 (1998)）、SP2/0細胞（マウスミエローマ）（K.Motmans et al., Eur.J.Cancer Prev.5, 512-519 (1996), R.P.Junghans et al., Cancer Res.50, 1495-1502 (1990)）などが好適に用いられる。また、形質転換にはリポフェクチン法（R.W.Malone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.US A 86, 6077 (1989), P.L.Felgner et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 7413 (1987)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法（F.L.Graham & A.J.van der Eb, Virology 52, 456-467 (1973)）、DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。そして、この形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト型CDR移植抗体が得られる。抗体は、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて分離、精製することができる。

【0025】

本発明の抗体を基に、又は当該抗体をコードする遺伝子の配列情報を基に抗体断片を作製することができる。抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv抗体が挙げられる。

Fabは、IgGをシステイン存在下パパイン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにC_H1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される分子量約5万の断片である。本発明では、上記抗体をパパイン消化することにより得ることができる。また、上記抗体のH鎖の一部及びL鎖をコードするDNAを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりFabを調製することもできる。

【0026】

Fab'は、後述のF(ab')₂のH鎖間のジスルフィド結合を切断することにより得ら

れる分子量が約5万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化し、還元剤を用いてジスルフィド結合を切断することにより得られる。また、Fab同様に、Fab'をコードするDNAを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

【0027】

F(ab')₂は、IgGをペプシン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにCH1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される断片(Fab')がジスルフィド結合で結合した分子量約10万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化することにより得られる。また、Fab同様に、F(ab')₂をコードするDNAを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

【0028】

scFvは、H鎖可変領域とL鎖可変領域とからなるFvを、片方の鎖のC末端と他方のN末端とを適当なペプチドリンカーで連結し一本鎖化した抗体断片である。ペプチドリンカーとしては、例えば柔軟性の高い(GGGGS)₃などを用いることができる。例えば、上記抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域をコードするDNAとペプチドリンカーをコードするDNAを用いてscFv抗体をコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりscFvを調製することができる。

【0029】

dsFvは、H鎖可変領域及びL鎖可変領域の適切な位置にCys残基を導入し、H鎖可変領域とL鎖可変領域とをジスルフィド結合により安定化させたFv断片である。各鎖におけるCys残基の導入位置は分子モデリングにより予測される立体構造に基づき決定することができる。本発明では、例えば上記抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域のアミノ酸配列から立体構造を予測し、かかる予測に基づき変異を導入したH鎖可変領域及びL鎖可変領域をそれぞれコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、そして当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりdsFvを調製することができる。

尚、適当なリンカーを用いてscFv抗体、dcFv抗体などを連結させたり、ストレプトアビジンを融合させたりして抗体断片を多量体化することもできる。

【0030】

本発明の抗体（抗体断片を含む）に低分子化合物、タンパク質、標識物質などを融合又は結合させることにより、融合抗体又は標識化抗体を構成することができる。標識物質としては、 ^{125}I 等の放射性物質、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミンイソチオシアネート（RITC）、アルカリホスファターゼ、ビオチンなどを用いることができる。

【0031】

本発明の第2の局面は、本発明の第1の局面の抗体をコードするDNAに関する。即ち、本発明の第2の局面は、GM1-A β を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体のDNAに関し、特に、当該活性を有するヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体をコードするDNA、及び抗体断片をコードするDNAを含む。また、これらの抗体又は抗体断片のH鎖又はL鎖をコードするDNAも本発明の一つである。更に、これらの抗体又は抗体断片のH鎖可変領域又はL鎖可変領域をコードするDNAも本発明の一つである。この場合において、シグナル部分を除いて構成されるDNAであってもよい。具体的なH鎖可変領域のDNA配列としては配列番号：9に示すものが挙げられる。またL鎖可変領域のDNA配列としては配列番号：10に示すものが挙げられる。

【0032】

更には、GM1-A β を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体の可変領域CDRをコードする遺伝子の配列も本発明の一つである。具体的には、配列番号：1に記載されるアミノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：11に記載される配列）、配列番号：2に記載されるアミノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：12に記載される配列）、配列番号：3に記載されるアミノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：13に記載される配列）、配列番号：4に記載されるアミノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：14に記載される配列）、配列番号：5に記載されるアミノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：15に記載される配列）、又は配列番号：6に記載されるアミノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：16に記載される配

列) からなるDNAである。以上のDNAは、化学合成、生化学的切断／再結合などにより作製でき、GM1-A β を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体、抗体断片の作製等に利用することができる。

【0 0 3 3】

本発明のDNAをベクターに組み込み、これを用いて宿主細胞を形質転換することができる。また、本発明のDNAの中で抗体重鎖（又は重鎖可変領域）をコードするDNAを一のベクターに組み込み、他方、抗体軽鎖（又は軽鎖可変領域）をコードするDNAを他のベクターに組み込み、得られた二つの発現ベクターで宿主細胞を共形質転換させることもできる。さらには、本発明のDNAの中で抗体重鎖（又は重鎖可変領域）をコードするDNA及び抗体軽鎖（又は軽鎖可変領域）をコードするDNAを一のベクターに組み込み、これを用いて宿主細胞を形質転換することもできる。

【0 0 3 4】

用いられるベクターの種類は、本発明のDNAを発現可能に組込むことができ、かつ宿主細胞で発現できるものであれば特に限定されない。

宿主細胞としては、使用するベクターにより形質転換されて本発明のDNAを発現できるものであればその種類を問わない。例えば、エッシャーヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等の細菌、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の酵母、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞を用いることができる。

【0 0 3 5】

形質転換体を培養することにより、形質転換体の細胞内又は培養液中にGM1-A β を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体又は抗体断片を産生（発現）させることができる。そして産生された抗体（抗体断片を含む）を回収することにより、本発明の第1の局面である抗体を得ることができる。得られた抗体は、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせで分離、精製することができる。

【0 0 3 6】

本発明の抗体が、GM1-A β を認識する活性を有するか否かは、被験対象をGM1-A

β に接触させ両者の結合性をみることにより確認できる。例えば、GM1ガングリオシド (GM1) 結合型アミロイド β タンパク質 ($A\beta$) (GM1- $A\beta$) を含む脂質膜を構成し、これと被験対象との結合性をみる。また、GM1を含む脂質膜を用意しておき、これに $A\beta$ を含む溶液及び被験対象抗体を同時に接触 (添加) することにより、被験対象のGM1- $A\beta$ 結合性を調べることもできる。GM1- $A\beta$ を含む脂質膜は、例えば、GM1を含む脂質膜に $A\beta$ を含む溶液を接触 (添加) することにより調製することができる。この場合、GM1を含む脂質膜と $A\beta$ を含む溶液との接触は短時間行われることが好ましく、更に好ましくは両者を瞬間的に接触させる。

GM1を含む脂質膜としては、GM1と脂質を成分として含有するものであれば特にその構成は限定されないが、脂質成分としてスフィンゴミエリンを含む脂質膜が好適に用いられる。また、コレステロールをさらに含む脂質膜が好適に用いられる。かかる脂質膜の構成はアミロイド繊維が形成される脳内の神経細胞膜のそれに近く、当該構成の脂質膜を用いることにより生体においてアミロイド繊維の形成を有効に抑制し得る抗体であることの確認が行えることとなる。

【0037】

GM1としては、例えば市販のもの (和光純薬工業株式会社、大阪、日本が提供するもの等) を使用することができる。 $A\beta$ としては、例えば、市販の $A\beta$ 1-40 (Lot.501001、ペプチド研究所、大阪、日本、Lot.519599、Bachem AG、スイスなど) などを使用することができる。

GM1を含む脂質膜はリポソーム状に調製し得る。また、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂やガラス等からなるビーズ、マイクロプレート等の不溶性支持体に脂質膜を結合させて使用することもできる。

尚、 $A\beta$ の存在下で被験対象とGM1- $A\beta$ の接触を行いアミロイド繊維の形成が抑制されれば、被験対象の抗体がGM1- $A\beta$ に結合し、かつアミロイド繊維の形成を抑制する活性を有することを確認できる。

【0038】

GM1- $A\beta$ を含む脂質膜はGM1- $A\beta$ に結合性を有する化合物のスクリーニングにも利用できる。即ち、以下の工程を含むことにより、GM1- $A\beta$ に結合性を有するの

化合物のスクリーニング方法を構成できる。

1) GM1 ガングリオシド結合型 アミロイド β タンパク質を含む脂質膜に試料を接触させる工程、及び 2) 前記脂質膜に結合した化合物を回収する工程である。

工程 1) において GM1 ガングリオシド結合型 アミロイド β タンパク質 (GM1-A β) を含む脂質膜は、リポソーム状又は不溶性支持体 (例えばマイクロプレート) に結合された状態で使用される。リポソーム状の脂質膜を用いる場合には、工程 2) において GM1-A β に結合した化合物を遠心法で分離し、精製することにより目的の化合物を得ることができる。また、候補化合物が抗体の場合には、calcein を内包させた GM1-A β 含有のリポソームを工程 1) の脂質膜として用い、そして補体の作用を利用することにより、リポソームが破壊されて放出される calcein 量を測定して候補化合物の GM1-A β 結合活性を測定することができる。一方、不溶性支持体に結合された状態の脂質膜を用いる場合において候補化合物が抗体のときには、EIA、ELISA 等により候補化合物の GM1-A β 結合活性を測定することができる。

【 0 0 3 9 】

上記の工程 1) に代えて、以下の工程 1-1) 及び 1-2) を行うこともできる。

1-1) GM1 ガングリオシドを含む脂質膜と アミロイド β タンパク質とを接触させ、GM1 ガングリオシド結合型 アミロイド β タンパク質を形成する工程、1-2) 前記脂質膜に試料を接触させる工程である。

工程 1-1) における GM1 ガングリオシド (GM1) を含む脂質膜と アミロイド β タンパク質 (A β) との接触は、例えば当該脂質膜を分散させた溶液中に A β を含む溶液を添加することにより行われる。また、固相に固定化した脂質膜 (例えば、マイクロプレートに結合した脂質膜) を用い、当該脂質膜に A β を含む溶液を接触させることによっても行うことができる。

上記の工程 1-1) 及び 1-2) を実質的に同時に行うこともできる。即ち、以下の工程を含むことにより、GM1-A β に結合性を有する化合物のスクリーニング方法を構成できる。

1') GM1 ガングリオシドを含む脂質膜を含む溶液に アミロイド β タンパク質と試料とを添加する工程である。

【0040】

以上の工程に加えて、アミロイド繊維の形成が抑制されることを確認する工程（工程3））を行うことにより、スクリーニング方法により選択される化合物がGM1-A β に結合性を有し、かつアミロイド繊維の形成を抑制する活性を有することを確認することが可能となる。例えば、回収されたGM1-A β 結合活性を有する化合物を、アミロイド繊維が形成される環境下に共存させ、アミロイド繊維形成に対する影響、効果を確認する。また、工程1)又は工程1-2)を行う際、試料とともにA β を添加し、そしてアミロイド繊維の形成を観察することによっても当該工程3)を行うことができる。

以上のスクリーニング方法により選択された化合物はGM1-A β に結合性を有する。従って、GM1-A β にA β が重合してアミロイド繊維が形成されることを抑制ないし防止することに利用できる。

【0041】

スクリーニング対象の試料としては、天然又は合成のタンパク質、ペプチド、抗体（本発明の抗体を含む）、細胞抽出液、培養上清などを用いることができる。

【0042】

本発明の第1の局面における抗体（抗体断片を含む）を利用してGM1-A β に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法を構成することができる。即ち、本発明は、以下の工程を含む、GM1-A β に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法も提供する。

i)本発明の第1の局面における抗体又は抗体断片に結合する第1の化合物を選択する工程、及びii)前記第1の化合物に結合する第2の化合物を選択する工程である。このスクリーニング方法においても、アミロイド繊維の形成が抑制されることを確認する工程を含ませることにより、スクリーニング方法により選択される化合物がGM1-A β に結合性を有し、かつアミロイド繊維の形成を抑制する活性を有することを確認することが可能となる。

工程i)では、抗体又は抗体断片と試料との結合性が調べられ、結合性を有する第1の化合物が選択される。ここでの試料には、上述の場合と同様に、天然又は

合成のタンパク質、ペプチド、抗体（本発明の抗体を含む）、細胞抽出液、培養上清などを用いることができる。

工程i)において、使用される抗体を固相に固定化しておき、これに試料を接触させることができる。これとは逆に、試料側を固相に固定化しておくこともできる。

【0043】

使用する抗体を予め標識化しておくことにより選択（検出）の容易化、選択（検出）効率の向上を図ることもできる。標識化には、 ^{125}I 等の放射性物質、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等の酵素等を用いることができる。また、使用する抗体を認識する二次抗体を用いて選択（検出）効率の向上を図ることもできる。

【0044】

本発明の第1の局面における抗体（抗体断片を含む）を、GM1-A β を認識する抗体に結合する化合物のスクリーニング方法に利用することもできる。即ち、以下の工程A)及びB)を含む、GM1-A β を認識する抗体に結合する化合物のスクリーニング方法を構成することができる。

A)本発明の抗体に試料を接触させる工程、及び

B)前記抗体に結合した化合物を回収する工程。

ここでの試料としては、天然又は合成のタンパク質、ペプチド、細胞抽出液、培養上清などが用いられる。

【0045】

また、以下の工程を含む、GM1-A β を認識する抗体に結合する化合物のスクリーニング方法を構成することもできる。

C)本発明の抗体の可変領域の立体構造を予測する工程、

D)前記立体構造に相補的な立体構造を有する化合物を選択する工程。

抗体可変領域の立体構造は、NMR（核磁気共鳴）法（Wuthrich, K. : NMR of Protein and Nucleic Acids, John Wiley & Sons, New York, 1986）、X線結晶構造解析（Blundell, T.L. and John, L.N. : Protein Crystallography, Academic Press, Oxford, pp.1-565, 1976、McPherson, A. : Preparation and Analysis o

f Protein Crystals, John Wiley & Sons, New York, pp.1-371,1982、松島正明ら：蛋白工学研究法,第7章,立体構造解析,廣川書店,東京,160-200,1990)等の方法により予測することができる。

工程D)における候補化合物としては、植物、動物、細菌などから抽出した天然タンパク質、天然ペプチド、天然高分子化合物等の他、合成タンパク質、合成ペプチド、合成高分子化合物、合成低分子化合物等を例示できる。

【0046】

以上のスクリーニング方法で取得される化合物は抗GM1-A β 抗体に結合する活性を有することから、生体に投与されれば抗GM1-A β 抗体の産生を惹起することができると考えられる。即ち、生体の備える免疫防御機構に作用して抗GM1-A β 抗体を産生させることができ、その結果、この抗体の作用により生体において形成されたGM1-A β にA β が重合してアミロイド繊維が形成されることを抑制することができると考えられる。従って、当該化合物を用いてアルツハイマー病を予防、又は治療することが可能と考えられる。換言すれば、当該化合物を用いることによりアルツハイマー病の予防方法、及び治療方法が提供される。また、当該化合物を有効成分として含有するアルツハイマー病に対する薬剤、即ちワクチン又は治療薬を構成できる。一方、上記のスクリーニング方法等で用いられるGM1-A β を含む脂質膜についても抗GM1-A β 抗体に認識されるため、これを生体に投与することにより抗GM1-A β 抗体の産生を惹起する作用を奏することができるものと考えられる。従って、当該脂質膜も同様の目的に使用することが可能といえる。

【0047】

製剤化する場合には、製剤上許容される他の成分（例えば、生理食塩水、賦形剤、防腐剤、）を含有させることができる。また、種々の形態に製剤化できる。例えば、カプセル剤、シロップ剤、錠剤、顆粒剤などとして調製でき、経口投与、非経口投与（静脈内、動脈内、皮下、筋肉、腹腔内注射など）により適用することができる。

投与量については、症状、患者の年齢、体重などによって異なるが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択、設定することが可能である。

【0048】

一方、本発明の抗体（抗体断片を含む）は、GM1-A β と特異的に結合し、アミロイド繊維の形成を抑制することができるため、アルツハイマー病の診断、予防、治療等に有用である。即ち、本発明の抗体を用いてアルツハイマー病の診断、予防、又は治療を行うことができると考えられる。換言すれば、本発明の抗体を用いることによりアルツハイマー病の診断方法、予防方法、及び治療方法が提供される。また、本発明の抗体を用いてアルツハイマー病に対する薬剤（診断薬、予防薬、又は治療薬）を構成できる。ここで、ヒト化した本発明の抗体を用いれば、ヒトに投与した場合であってもヒトタンパク質と認識されるため循環器系から排除されにくく、またアレルギー反応もおこり難いので、好適な診断薬等として用いることができると考えられる。一方、上記のスクリーニング方法で選択されるGM1-A β に結合性を有する化合物もアルツハイマー病の診断方法、予防方法、治療方法に用いることができる。また、当該化合物を用いてアルツハイマー病に対する薬剤（診断薬、予防薬、又は治療薬）を構成することもできる。

【0049】

本発明の薬剤には、製剤上許容される他の成分（例えば、生理食塩水、賦形剤、防腐剤、）を含有させることができる。また、種々の形態に製剤化できる。例えば、カプセル剤、シロップ剤、錠剤、顆粒剤などとして調製でき、経口投与、非経口投与（静脈内、動脈内、皮下、筋肉、腹腔内注射など）により適用することができる。尚、本発明の抗体を複数組み合わせることで薬剤を構成してもよい。

投与量については、症状、患者の年齢、体重などによって異なるが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択、設定することが可能である。

【0050】

【実施例】

【実施例1】 IgG型抗体の作製

1-1) 可変領域の遺伝子配列の決定

先の論文 (K.Yanagisawa, J.McLaurin, M.Michikawa, A.Chakrabartty, Y.Ihara, FEBS Lett., 420, 43 (1997)) に記載される抗体 (4396抗体) を産生するハイブリドーマ (以下、「A β 1-42C」という) の可変領域の遺伝子配列を以下の手順

で決定した。尚、A β 1-42Cは、脳から精製したGM1-A β を免疫源として作製されたハイブリドーマであり、4396抗体はGM1-A β を特異的に認識するIgMクラスの抗体である。

まず、「ZAPcDNAキット」（ストラタジーン社）を用いてA β 1-42CのcDNAライブラリーを作製した。作製方法はキット中のプロトコールに従った。A β 1-42CをDMEM/10%FCSで培養し、約 3×10^7 個の細胞よりポリA+RNAを調製した。そのポリA+RNA 5 μ gより第1鎖cDNAを合成した後、第2鎖cDNAを合成し、次にリンカー（EcoRI、XhoIサイトをもつ）をライゲーションし、そのcDNAをキット中の「Uni-ZAP XRベクター」のEcoRI/XhoIサイトに組み込んだ。次に「ZAPcDNA Gigapack III Gold Cloning Kit」（ストラタジーン社）を用いてベクターをVCMG13ファージにパッケージングした。

【 0 0 5 1 】

そのファージを「ZAPcDNA Gigapack III Gold Cloning Kit」中の大腸菌/XL-I blueに感染させ、培地上でプラークを形成させた後、以下のようにしてプラークハイブリダイゼーションを行った。プローブは、予めPCRで増殖させた μ 鎖遺伝子（H鎖定常領域）フラグメントと λ 鎖遺伝子（L鎖定常領域）フラグメントを用いた。

プラークを形成させたNZY培地上に「Hybond-N+メンブレン」（アマシャム社）をのせ、プラークをメンブレンに転写させた後、メンブレンを1.5M NaCl/0.5M NaOHで2分、次に1.5M NaCl/0.5M Tris-HCl(pH7.5)で5分、0.2MTris-HCl(pH7.5)/2 \times SSCで30秒処理し風乾させ「ECL direct nucleic acid labeling and detection systems」（アマシャム社）を用いてDNAプローブをラベルし、そのラベルプローブとメンブレンを42 $^{\circ}$ C、4時間インキュベートした後、洗浄し、発色基質に浸した。次にそのメンブレンを「Hyper-film ECL」（アマシャム社）に密着させ5分感光した。そのフィルムをもとに培地よりポジティブプラークを単離した。ポジティブファージを選択した後、「Uni-ZAP XRベクタークロニングキット」（ストラタジーン社）を用いて、ポジティブファージを該キットに添付の大腸菌/SOLR株に感染させ、ファージ中の「Uni-ZAP XR DNA」から、ファージミドを切り出させた。その大腸菌/SOLR株からファージミドDNAをアルカリSDS法により精製

した。そして、これらファージミドDNA中のインサートの配列をジデオキシ法により決定した。

【 0 0 5 2 】

その結果、これらのDNAは、それぞれ μ 鎖遺伝子（H鎖定常領域）と λ 鎖遺伝子（L鎖定常領域）を含んでいた。そして、各DNAよりH鎖可変領域（V_H）及びL鎖可変領域（V_L）の遺伝子配列及びアミノ酸配列が図1及び図2に示されるように決定された。図1及び図2において、CDRは相補性決定部位（complementarity determining region）を表す。尚、H鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号：7（1位から19位までの配列はシグナル配列をコードする）に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：9（1位から57位までの配列はシグナル配列をコードする）に、L鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号：8（1位から19位までの配列はシグナル配列をコードする）に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：10（1位から57位までの配列はシグナル配列をコードする）に示す。また、H鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列を配列番号：1に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：11に、CDR2のアミノ酸配列を配列番号：2に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：12に、CDR3のアミノ酸配列を配列番号：3に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：13に示す。同様に、L鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列を配列番号：4に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：14に、CDR2のアミノ酸配列を配列番号：5に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：15に、CDR3のアミノ酸配列を配列番号：6に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：16に示す

【 0 0 5 3 】

1-2) H鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターの作製

4396抗体由来の上記H鎖可変領域DNAをマウスIgG2a抗体H鎖定常領域DNAとライゲーションし、発現ベクター「BCMGS Neoベクター」（鳥山一「ウシパピローマウイルスベクター」, 村松正実および岡山博人編, 実験医学別冊 遺伝子工学ハンドブック, 羊土社, pp.297-299 (1991)) (XhoI及びNotIで切断) に組み込みH鎖発現ベクター (BCMGSneo-H) を構築した (図3 (A))。同様に、4396抗体由来の上記L鎖可変領域DNAをマウスIgG2a抗体L鎖定常領域DNAとライゲーションし、発現

ベクター「BCMGS Neoベクター」(XhoI及びNotIで切断)に組み込みL鎖発現ベクター(BCMGSneo-L)を構築した(図3(B))。

【0054】

1-3) トランスフェクション

H鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターをCHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞にリポフェクチン法を用いて同時にトランスフェクションし、37℃で12時間培養した後96穴プレートに移植し、G-418 500 μ g/mlを含むDMEM/10%FCSで選択した。

【0055】

培養液中のIgG量は以下のようにして測定した。抗マウス γ 鎖(株式会社医学生物学研究所:code 303G)を10 μ g/mlにPBSで希釈調製し、ポリスチレン製マイクロプレートに100 μ l/ウェルずつ分注し、4℃で一晩感作させた。次に、5%BSA/5%ショ糖/PBSを用いて4℃で一晩ブロッキングした。100 μ lのサンプルを37℃で1時間反応させた後、PBS/0.05%Tween20で洗浄した。洗浄後、4000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(株式会社医学生物学研究所:code 330)を37℃で1時間反応させ、PBS/0.05%Tween20で洗浄後、酵素基質液を100 μ l分注して室温で15分反応させた。そして、各ウェルに2N硫酸を100 μ lずつ分注し、A492を測定した。コントロールには、マウス血清(IgG量:200ng/ml、20ng/ml、2ng/ml、0.2ng/ml)を用いた。このようにして、最も発現量の多いクローンを選択し、その培養上清を回収した。回収された培養上清より、protein Aアガロースカラムを用いて抗体を精製した。その結果得られた抗体を4396C抗体とした。

【0056】

[実施例2] 4396C抗体のGM1-A β に対する結合性の検討

GM1によるアミロイド繊維形成開始の分子機構を解明するために、GM1を含有するリポソームを用いて動力学的及び形態学的解析を行った。

2-1) A β 溶液の調製

合成A β ₁₋₄₀(Lot.501001、ペプチド研究所、大阪、日本)を最初に0.002%のアンモニア溶液に約500 μ Mとなるように溶解し、100,000rpmで3時間遠心した(TLA120.0ローター、Optima TL、ベックマン、カルフォルニア州、米国)。上清

の上 3 分の 2 を集め、 $A\beta$ の濃度を決定した。 $A\beta$ 溶液は小分けして使用時まで -8°C に保存した。使用直前に溶解し、生理的トリス緩衝液 (TBS: 150mM NaCl 及び 10mM Tris-HCl, pH7.4) で適切な濃度に希釈した。

【 0 0 5 7 】

2 - 2) GM1 含有リポソームの調製

コレステロールとスフィンゴミエリン (シグマ-アルドリッチ、セントルイス、ミズーリー州、米国) 及び GM1 (和光純薬工業株式会社、大阪、日本) をクロロホルム/メタノール混液 (1:1) に 2:2:1 の割合で 1 モル濃度に溶解した。この混液を窒素ガスで 1 時間乾燥し、 -40°C で使用時まで保存した。使用直前に乾燥した脂質混合物を GM1 濃度が 2.5mM になるように TBS に再懸濁し、液体窒素を用いて 10 回凍結溶解を行った。この脂質懸濁液を 13,000rpm で 15 分間遠心し (MX-160、TOMY、東京、日本)、沈渣を再度 GM1 が同濃度になるよう TBS に再懸濁した。最後にこの懸濁液を氷上で 5 分間マイクロチップ (TP-030、TOMY、東京、日本) を備えた超音波破碎機 (UD-201、出力レベル 2、TOMY、東京、日本) を用いて超音波処理し、これを 3 回繰り返した。

【 0 0 5 8 】

2 - 3) 線維形成の核としての繊維状 $A\beta$ (f $A\beta$) の調製

合成された $A\beta_{1-40}$ (Bachem AG, スイス、Lot. 519599) を 4°C で約 $500\mu\text{M}$ のアンモニア溶液に短時間ボルテックスすることにより溶解し、インキュベーションバッファー (50mM リン酸緩衝液、pH7.5; 100mM NaCl) で $50\mu\text{M}$ に希釈した。 37°C で 24 時間インキュベートした後、混合液を $1.6 \times 10^4\text{g}$ 、 4°C で 3 時間遠心した。エッペンドルフチューブ内で、沈渣を 0.005% NaN_3 を含む氷冷したインキュベーションバッファーに再懸濁し、マイクロチップ (TP-030、TOMY、東京、日本) を備えた超音波破碎機 (UD-201、TOMY、東京、日本) を用いて氷上で超音波処理し、使用時まで 4°C で保存した。

【 0 0 5 9 】

2 - 4) ThT (チオフラビン T) アッセイ

分光蛍光光度計 (RF-5300PC、株式会社島津製作所、京都、日本) を用い、文献 (H. Naiki, F. Gejyo, Methods Enzymol. 309, 305 (1999)) に記載される方

法に従ってThTアッセイを行った。まず、2-1) で調製されたA β 溶液と、2-2) で調製されたA β 濃度50 μ Mのリポソーム (GM1:A β =10:1) 又は2-3) で調製された10 μ g/mlのfA β をPCRチューブ (ELT-0.5 Ryocou) 中に入れ、Dry Thermo Unit Incubator (DTU-1B、タイテック、越谷、日本) を用いて37°Cでインキュベートした。測定直前に各チューブから5 μ lのインキュベーション混液を取り、5 μ MのThTを含む50mMグリシン-NaOHバッファー (pH8.5) 995 μ lに混合した後、アミロイド繊維の至適蛍光 (励起波長450nm、蛍光波長490nm) を測定した。測定結果をグラフにまとめたものを図4に示す。図4Aにおいて、■はA β 溶液とリポソームとをインキュベーションした場合の蛍光、△はA β 溶液とfA β とをインキュベーションした場合の蛍光である。リポソームとともにインキュベーションした場合には、蛍光がラグフェーズなく直ちに増加し、双曲線的に平衡に達するのがわかる。

【0060】

尚、リポソームもfA β も加えずにインキュベーションをした場合 (○) には全く蛍光は増加していない。図4Bは、 $F(\infty)-F(t)$ 対インキュベーション時間 (0~24時間) の方対数プロットである。 $F(t)$ は、A β をリポソームと共にインキュベートした場合の時間の関数としての蛍光の増加を表しており、 $F(\infty)$ は試験的に決定した。直線回帰と相関係数を計算した ($r=0.997$)。 $F(t)$ が $F_{\infty}-B \cdot \exp(-t/\tau)$ の形で表されること、即ち、一次回帰モデル (参考文献18参照) に従うことがわかる。このように、リポソームの存在下における繊維形成が一次回帰モデルで進行することが示された。

【0061】

図4Cは、fA β を加えて24時間インキュベートした混液 (上の写真) 及びリポソームを加えて96時間インキュベートした混液 (下の写真) の電子顕微鏡写真である。これらの写真から、リポソームの存在下において典型的なアミロイド繊維が形成されることがわかる。尚、図4Cにおいて横棒は100nmを表す。

【0062】

以上の結果より、まず可溶性のA β が膜状ですばやくGM1に結合し、これによりGM1-A β 複合体 (GM1-A β) の形成がなされ、続いてGM1-A β がheterologousなsee

dとなり、これに可溶性A β が結合すること、及び連続的に伸長する繊維の末端に可溶性A β が結合することによりアミロイド繊維の形成が進むことが強く示唆された。

【 0 0 6 3 】

[実施例 3] 4396C抗体のアミロイド繊維形成阻害能の検証

3 - 1) 4396C抗体の結合能の検討

実施例 1 で調製した4396C抗体がリポソーム中においてGM1と結合したA β (GM1-A β) を特異的に認識するか否かを検討した。まず、実施例 2 で調製したGM1含有リポソーム又はGM1を欠いたリポソーム (比較対照) を実施例 2 で調製したA β 溶液とインキュベーションした。インキュベーション混液は、炭素コートしたor mvarnickel gridに載せるまで氷上で保存した。1%ウシ血清アルブミンで12℃、5分間インキュベートすることにより非特異結合をブロッキングした。次に、各gridを4396C抗体又は4G8抗体 (A β を認識する公知の抗体: K.S.Kim, et al., Neurosci. Res. Commun. 2, 121 (1988)) で終濃度20 μ g/ml、12℃、45分間の条件において処理した。その後、20分の1に希釈した5nmの金標識抗マウスIgG (British BioCell International Ltd.) で12℃、60分間処理した。そして、2%の酢酸ウランニウムでネガティブ染色を行った。

【 0 0 6 4 】

図 5 Aは、染色結果を示した電子顕微鏡写真である。左の写真はGM1含有リポソーム (CH: コレステロール、SM: スフィンゴミエリン、GM1: GM1ガングリオシド) とA β 溶液をインキュベーションしたサンプルを4396C抗体で染色した結果、中央の写真はGM1含有リポソームとA β 溶液をインキュベーションしたサンプルを4G8抗体で染色した結果、右の写真はGM1を欠くリポソーム (CH: コレステロール、SM: スフィンゴミエリン) とA β 溶液をインキュベーションしたサンプルを4396C抗体で染色した結果である。GM1含有リポソームは4396C抗体で標識されるが (左の写真)、4G8では標識されない (中央の写真) ことがわかる。また、4396C抗体はGM1を欠いたリポソームを認識しないことがわかる (右の写真)。尚、横棒は50nmを表す。以上の結果より、4396C抗体はリポソーム中に形成されたGM1-A β を特異的に認識することが示された。また、良く知られた抗A β 抗体の一つである4

G8抗体はGM1-A β を認識できないことが示された。

【0065】

次に、4396C抗体と、GM1又は可溶性のA β との反応性をウエスタンブロットにより検討した。実施例2で調製したA β 溶液をニトロセルロース膜上にブロット (1ng) したものを4396C抗体又は4G8抗体とインキュベーションし、その後上記と同様に標識化することによりA β と各抗体との反応性を調べた。同様に、GM1 (和光純薬工業株式会社、大阪、日本) に対する4396C抗体の反応性を調べた。比較対照として、4396C抗体の代わりにPOD標識コレラトキシンサブユニットB (CTX) (シグマ) をインキュベーションした。図5Bにインキュベーション後のメンブレンの写真を示す。4396C抗体は可溶性のA β ともGM1とも全く反応しないことがわかる。

【0066】

続いて、4396C抗体と凝集性A β との反応性を検討した。アルツハイマー病患者の脳皮質切片を4%のホルムアルデヒドで固定、パラフィン包埋した後、蟻酸で前処理した。その後、4396C抗体又は4G8抗体で免疫標識した。図5Cに示されるように、4G8抗体を用いた場合 (右の写真) は神経斑点が強く免疫染色されたが、4396C抗体を用いた場合 (左の写真) では全く染色されなかった。尚、矢印は一連の切片の脈管を示す。

以上の一連の結果より、可溶性A β から凝集性A β への過渡的な形態であるA β の中間体はA β がGM1へ結合することにより生ずることが示されるとともに、4396C抗体は、公知の他の抗A β 抗体とは異なり、可溶性のA β でも凝集性のA β でもなくGM1に結合した状態のA β 、即ちGM1-A β を特異的に認識するものであることが明らかとなった。

【0067】

[実施例4]

GM1含有リポソームの存在下におけるアミロイド繊維の形成が、4396C抗体によって阻害されうるかどうかの検討を試みた。

実施例2で調製したA β 溶液及びGM1含有リポソーム、並びに4396C抗体を同時にインキュベーションし、アミロイド繊維形成を上記のThTアッセイにより調べ

た。比較対照として4396C抗体の代わりに4G8抗体をインキュベーションした。結果を図6Aに示す。4396C抗体分子のA β 分子に対する割合は、0.3:50 (Δ)、1.3:50 (\circ)、4:50 (\square) である。また、A β に対する4G8抗体分子のA β 分子に対する割合は4:50 (\diamond) である。■はいずれの抗体も加えずにインキュベーションを行った場合の結果である。図6Aに示すように、4396CはThTの蛍光の増加を投与量依存的に阻害した。反対に、他の抗A β 抗体である4G8は蛍光の増加を全く阻害しなかった。

【0068】

図6Bは、GM1含有リポソームの添加に続いて、合成したA β ₁₋₄₀と4G8の混合物を24時間同時にインキュベートした場合の免疫電顕写真である。検体をグリッド上に置き、ウシ血清アルブミンでのブロッキングに続いて金標識抗マウスIgGで直接処理した。尚、横棒は100nmを表す。この結果から、明らかに4G8抗体は新たに形成されたアミロイド繊維の端に結合することがわかる。

【0069】

[実施例5] ヒト型キメラ抗体の作製

5-1) ヒト γ 鎖定常領域遺伝子、及びヒト λ 鎖定常領域遺伝子の単離

ヒト γ 鎖定常領域DNA、及びヒト λ 鎖定常領域DNAは、ヒトリンパ球cDNAライブラリーより各DNAの一部に相補的なDNAをテンプレートにして取得される。

【0070】

5-2) キメラH鎖ベクター、及びキメラL鎖ベクターの作製

まず、ヒト γ 鎖定常領域DNAと実施例1で得られるマウスH鎖可変領域DNAとをライゲーションし、これを発現ベクター「BCMGS Neoベクター」(烏山一「ウシバピローマウイルスベクター」, 村松正実および岡山博人編, 実験医学別冊 遺伝子工学ハンドブック, 羊土社, pp. 297-299 (1991)に組み込みキメラH鎖ベクターを作製する。同様に、ヒト λ 鎖定常領域DNAと実施例1で得られるマウスL鎖可変領域DNAとをライゲーションし、これをBCMGS Neoベクターに組み込み、キメラL鎖ベクターを作製する。

【0071】

5-3) トランスフェクション

2種類のベクター（キメラH鎖ベクター、キメラL鎖ベクター）をCHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞にリポフェクション法を用いて同時にトランスフェクションし、37℃で所定時間培養した後、96穴プレートに移植し、ネオマイシン500 μ g/mlを含むDMEM/10%FCSで選択する。

培養液中のIgG量は以下のようにして測定する。抗ヒト γ 鎖（株式会社医学生物学研究所：code 103AG）を10 μ g/mlにPBSで希釈調製し、ポリスチレン製マイクロプレートに100 μ l/ウェルずつ分注し、4℃で一晩感作させる。次に、5%BSA/5%ショ糖/PBSを用いて4℃で一晩ブロッキングする。100 μ lのサンプルを37℃で1時間反応させた後、PBS/0.05%Tween20で洗浄する。洗浄後、4000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG（株式会社医学生物学研究所：code 208）を37℃で1時間反応させ、PBS/0.05%Tween20で洗浄後、酵素基質液を100 μ l分注して室温で15分反応させる。そして、各ウェルに2N硫酸を100 μ lずつ分注し、A₄₉₂を測定する。コントロールには、ヒト血清（IgG量：200ng/ml、20ng/ml、2ng/ml、0.2ng/ml）を用いる。このようにして、最も発現量の多いクローンを選択し、その培養上清を回収する。回収された培養上清より、protein Aアガロースカラムを用いて抗体を精製する。

【0072】

〔実施例6〕 ヒト型CDR移植抗体の作製

6-1) ヒト型CDR移植抗体の設計

H鎖及びL鎖について、公知のデータベース（例えば、Fasta database search）より4396C抗体のH鎖及びL鎖とホモロジーの高い配列をそれぞれ選択する。そして、これらの配列のFRと4396C抗体のCDRを備える配列を設計する。

【0073】

6-2) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの作製

6-1) で設計されたH鎖可変領域DNA及びL鎖可変領域DNAは次のように作製することができる。

最初に、合成DNAを図7に示すように8本作製した。これら合成DNAは可変領域の約400bpをカバーし、且つそれぞれ約20bpずつオーバーラップするように作製されている。これら合成DNA 10pmol/10 μ lを100℃で5分処理した後、急冷し、合

成DNAの1と2、3と4、5と6、7と8をそれぞれ混ぜ、ヒートブロックで65℃、30分加熱したのち、12時間放置し、ゆっくりとアニールさせる。次に、20mM dNTPを1 μ l、シーケナーゼ（アマシャム社）1 μ l、5 \times シーケナーゼバッファー10 μ lを加え、滅菌水で最終的に50 μ lとし、37℃、1時間インキュベートする。このDNAフラグメント（1-2、3-4、5-6、7-8）を2%アガロースで泳動し、切り出し、30 μ lの滅菌水に溶解する。次に、切り出したDNAフラグメント1-2と3-4、5-6と7-8、それぞれ2 μ lに、Pfuポリメラーゼ1 μ l、DMSO 5 μ l、10 \times Pfuバッファー9 μ lを加え、滅菌水を加え90 μ lとしたのち、PCRを94℃1分、55℃1分、72℃2分の条件で6サイクル行う。次に、10 \times バッファー1 μ l、20 μ Mプライマー（aとb、またはcとd）をそれぞれ5 μ l加え、PCRをさらに94℃1分、55℃1分、72℃2分で25サイクル行う。増幅されたDNAフラグメント（1-2-3-4と5-6-7-8）を切り出し、30 μ lの滅菌水に溶解し、それぞれのDNA2 μ lを用いてPCRを前述の条件で6サイクル行い、プライマーe、fを加えてさらにPCRを前述の条件で25サイクル行う。得られたDNAフラグメントを切り出し、pT7blueTベクターにクローニングし、配列を確認する。

【 0 0 7 4 】

次に、実施例 5 と同様に、発現ベクターである「BCMGS Neoベクター」と、PCRにて制限酵素サイトを付けた合成H鎖可変領域DNAと、ヒト γ 鎖DNAとをライゲーションし、CDRH鎖ベクターを作製する。同様に、合成L鎖可変領域DNAとヒト λ 鎖DNAとが組込まれたCDRL鎖ベクターを作製する。

【 0 0 7 5 】

6-3) トランスフェクション

CDRH鎖ベクター及びCDRL鎖ベクターをCHO細胞にリポフェクション法を用いて同時にトランスフェクションし、37℃、12時間培養した後、96穴プレートにまき直し、ネオマイシン500 μ g/mlを含むDMEM/10%FCSで選択する。その後、ELISAにて最も発現量の多いクローンを選択する。培養上清を回収し、Protein Aアガロースカラムを用いて抗体を精製する。

【 0 0 7 6 】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるもので

はない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

【 0 0 7 7 】

【発明の効果】

本発明により、これまでに知られているアミロイド β タンパク質に対する抗体とは異なり、可溶性のアミロイド β タンパク質ではなくGM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体の情報（アミノ酸配列、DNA配列）が提供される。また、当該活性を有する抗体（抗体断片を含む）が提供される。特に、CDRの情報を基にヒト化抗体の作製が可能となる。これらの抗体は、アルツハイマー病の診断、予防、治療に有効な手段となる。

【 0 0 7 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

<120> Antibodies which recognize GM1 ganglioside-bound amyloid b-protein, and DNA encoding them.

<130> P01024

<140>

<141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gly Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Ala Asn Trp Val Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Gly Thr Ser Asn Arg Ala Pro

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ala Leu Trp Tyr Ser Thr His Tyr Val

1 5

<210> 7

<211> 136

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Met Gly Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

20 25 30

Thr Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn

65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 8

<211> 129

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Ala Trp Thr Ser Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Leu Cys Ser Gly
1 5 10 15

Ala Ser Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
20 25 30

Pro Gly Gly Thr Val Ile Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
50 55 60

Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Ser Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro
65 70 75 80

Val Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile
85 90 95

Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Asp Ala Met Tyr Phe Cys Ala Leu Trp
100 105 110

Tyr Ser Thr His Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
115 120 125

Gly

<210> 9

<211> 408

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(408)

<400> 9

atgggatgga tctggatctt tctcttcctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccactctgag 60
gtccagctgc agcagtctgg acctgagcta gtgaagactg gggcttcagt gaagatatcc 120
tgcaaggctt ctggttactc attcactggt tactacatgc actgggtcaa gcagagccat 180
ggaaagagcc ttgagtggat tggatatatt agttgttaca atggtgctac tagctacaac 240
cagaagttca agggcaaggc cacatttact gtagacacat cctccagcac agcctacatg 300
cagttcaaca gcctgacatc tgaagactct gcggtctatt actgtgcaag aggggctaac 360
tgggtctttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 408

<210> 10

<211> 387

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(387)

<400> 10

atggcctgga cttcacttat actctctctc ctggctctct gctcaggagc cagttcccag 60
gctgtttgtga ctcaggaatc tgcactcacc acatcacctg gtggaacagt catactcact 120
tgtcgctcaa gtactggggc tgttacaact agtaactatg ccaactgggt ccaagaaaaa 180
ccagatcatt tattcactgg tctaataagg ggtaccagca accgagctcc aggtgttcct 240
gtcagattct caggctccct gattggagac aaggctgccc tcaccatcac aggggcacag 300
actgaggatg atgcaatgta tttctgtgct ctatggtaca gcacccatta tgttttcggc 360
ggtggaacca aggtcactgt cctaggt 387

<210> 11

<211> 15

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> V_segment

<222> (1)..(15)

<400> 11

ggttactaca tgcac 15

<210> 12

<211> 51

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> V_segment

<222> (1)..(51)

<400> 12

tatattagtt gttacaatgg tgctactagc tacaaccaga agttcaaggg c 51

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> V_segment

<222> (1)..(24)

<400> 13

ggggctaact gggctcttga ctac 24

<210> 14

<211> 42

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> V_segment

<222> (1)..(42)

<400> 14

cgctcaagta ctggggctgt tacaactagt aactatgcca ac 42

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> V_segment

<222> (1)..(21)

<400> 15

ggtaccagca accgagctcc a 21

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> V_segment

<222> (1)..(27)

<400> 16

gctctatggg acagcaccca ttatggt 27

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識する抗体の H 鎖可変領域の遺伝子配列及びアミノ酸配列を示す図である。CDR は相補性決定部位 (complementarity determing region) を表す。また、signal sequence はシグナル部分の配列である。

【図 2】

図 2 は、GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識する抗体の L 鎖可変領域の遺伝子配列及びアミノ酸配列を示す図である。CDR は相補性決定部位 (complementarity determing region) を表す。また、signal sequence はシグナル部分の配列である。

【図 3】

図 3 は、実施例 1 における発現ベクターの構成を示した図である。図 3 (A) には、H 鎖発現ベクター (BCMGSneo-H) の構成が示される。図 3 (B) には、L 鎖発現ベクター (BCMGSneo-L) の構成が示される。

【図 4】

図 4 は、実施例 2 における ThT アッセイの測定結果をまとめたグラフである。図 4 A において、■ は $A\beta$ 溶液とリポソームとをインキュベーションした場合の蛍

光、 Δ は $A\beta$ 溶液と $fA\beta$ とをインキュベーションした場合の蛍光である。リポソームとともにインキュベーションした場合には、蛍光がラグフェーズなく直ちに増加し、双曲線的に平衡に達するのがわかる。

リポソームも $fA\beta$ も加えずにインキュベーションをした場合（○）には全く蛍光は増加していない。

図4Bは、 $F(\infty) - F(t)$ 対インキュベーション時間（0～24時間）の方対数プロットである。 $F(t)$ は、 $A\beta$ をリポソームと共にインキュベートした場合の時間の関数としての蛍光の増加を表しており、 $F(\infty)$ は試験的に決定した。

図4Cは、 $fA\beta$ を加えて24時間インキュベートした混液（上の写真）及びリポソームを加えて96時間インキュベートした混液（下の写真）の電子顕微鏡写真である。横棒は100nmを表す。

【図5】

図5には実施例3の結果が示される。図5Aは、染色結果を示した電子顕微鏡写真である。左の写真はGM1含有リポソーム（CH：コレステロール、SM：スフィンゴミエリン、GM1：GM1ガングリオシド）と $A\beta$ 溶液をインキュベーションしたサンプルを4396C抗体で染色した結果、中央の写真はGM1含有リポソームと $A\beta$ 溶液をインキュベーションしたサンプルを4G8抗体で染色した結果、右の写真はGM1を欠くりポソーム（CH：コレステロール、SM：スフィンゴミエリン）と $A\beta$ 溶液をインキュベーションしたサンプルを4396C抗体で染色した結果である。GM1含有リポソームは4396C抗体で標識されるが（左の写真）、4G8では標識されない（中央の写真）ことがわかる。また、4396C抗体はGM1を欠いたリポソームを認識しないことがわかる（右の写真）。横棒は50nmを表す。

図5Bは、4396C抗体と、GM1又は可溶性の $A\beta$ との反応性をウエスタンブロットにより検討した結果を示す写真である。

図5Cは、4396C抗体と凝集性 $A\beta$ との反応性を検討した結果を示す。アルツハイマー病患者の脳皮質切片をホルムアルデヒド等で処理した後、4396C抗体又は4G8抗体で免疫標識した写真である。4G8抗体を用いた場合（右の写真）は神経斑点が強く免疫染色されるが、4396C抗体を用いた場合（左の写真）は全く染色されていないことがわかる。矢印は一連の切片の脈管を示す。

【図 6】

図 6 Aには、 $A\beta$ 溶液、GM1含有リポソーム、及び4396C抗体を同時にインキュベーションし、アミロイド繊維形成をThTアッセイにより調べた結果が示される。4396C抗体分子の $A\beta$ 分子に対する割合は、0.3:50 (\triangle)、1.3:50 (\circ)、4:50 (\square) である。また、 $A\beta$ に対する4G8抗体分子の $A\beta$ 分子に対する割合は4:50 (\diamond) である。■はいずれの抗体も加えずにインキュベーションを行った場合の結果である。

図 6 Bは、GM1含有リポソームの添加に続いて、合成した $A\beta_{1-40}$ と4G8の混合物を24時間同時にインキュベートした場合の免疫電顕写真である。金標識抗マウスIgGで標識化を行っている。横棒は100nmを表す。

【図 7】

図 7 は、実施例 6 におけるヒト型CDR移植抗体可変領域DNAの合成方法を模式的に示した図である。

【書類名】

図面

【図 1】

Filename : A β antibody heavy chain variable region
Sequence Size : 408
Sequence Position: 1 - 408

signal sequence

10 20 30 40 50 60
ATGGGATGGATCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAAGTGCAGGTGTCCACTCTGAG
M G W I W I F L F L L S G T A G V H S E

70 80 90 100 110 120
GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTAGTGAAGACTGGGGCTTCAGTGAAGATATCC
V Q L Q Q S G P E L V K T G A S V K I S

CDR1

130 140 150 160 170 180
TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGTTACTACATGCACITGGGTCAAGCAGAGCCAT
C K A S G Y S F T G Y Y M H W V K Q S H

CDR2

190 200 210 220 230 240
GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAGTTGTTACAATGGTGCTACTAGCTACAAC
G K S L E W I G Y I S C Y N G A T S Y N

250 260 270 280 290 300
CAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTTACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATG
Q K F K G K A T F T V D T S S S T A Y M

CDR3

310 320 330 340 350 360
CAGTTCAACAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGGGCTAAC
Q F N S L T S E D S A V Y Y C A R G A N

370 380 390 400
TGGGTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
W V F D Y W G Q G T T L T V S S

【図 2】

Filename : A β antibody light chain variable region
Sequence Size : 387
Sequence Position: 1 - 387

signal sequence

10 20 30 40 50 60
ATGGCCTGGACTTCACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTCTGCTCAGGAGCCAGTCCAG
M A W T S L I L S L L A L C S G A S S Q

70 80 90 100 110 120
GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCATCACCTGGTGGAACAGTCATACTCACT
A V V T Q E S A L T T S P G G T V I L T

CDR1

130 140 150 160 170 180
TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAGTAACTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAAA
C R S S T G A V T T S N Y A N W V Q E K

CDR2

190 200 210 220 230 240
CCAGATCATTATTCACCTGGTCTAATAGGTGGTACCAGCAACCGAGCTCCAGGTGTTCTCT
P D H L F T G L I G G T S N R A P G V P

250 260 270 280 290 300
GTCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG
V R F S G S L I G D K A A L T I T G A Q

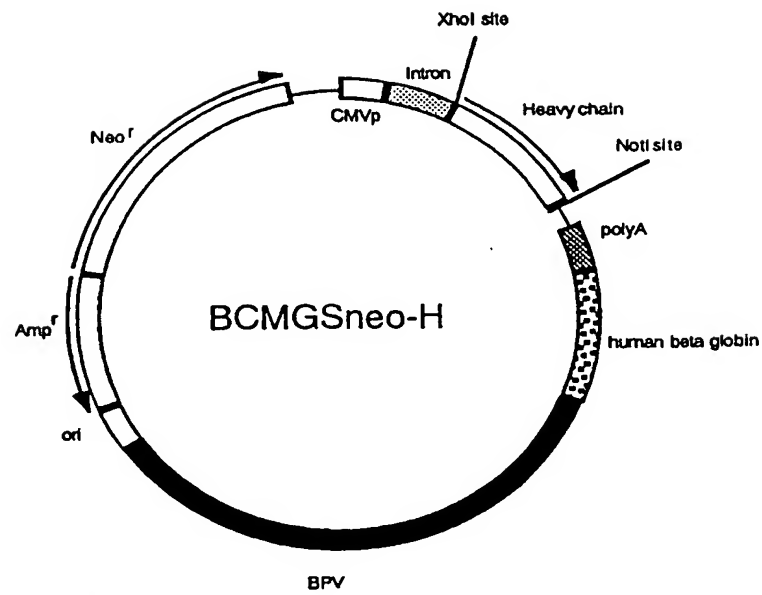
CDR3

310 320 330 340 350 360
ACTGAGGATGATGCAATGTATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCACCCATTATGTTTCGGC
T E D D A M Y F C A L W Y S T H Y V F G

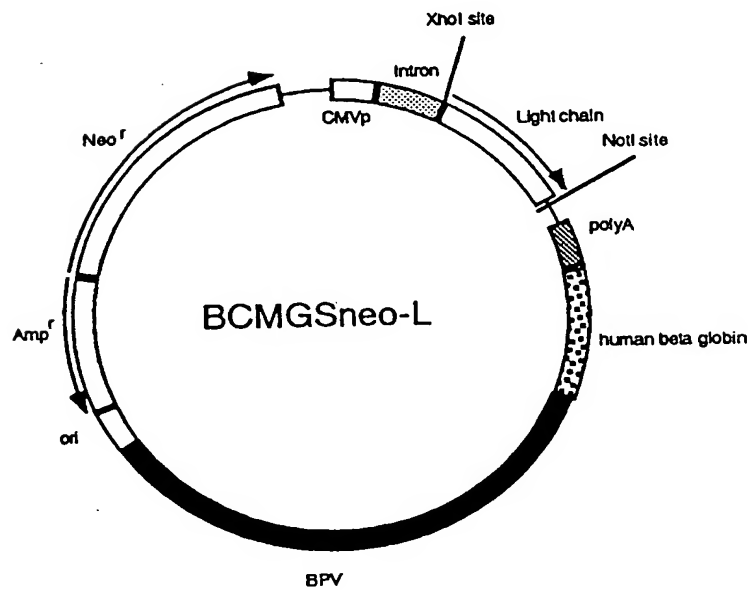
370 380
GGTGGAACCAAGGTCACCTGTCCTAGGT
G G T K V T V L G

【図 3】

(A)

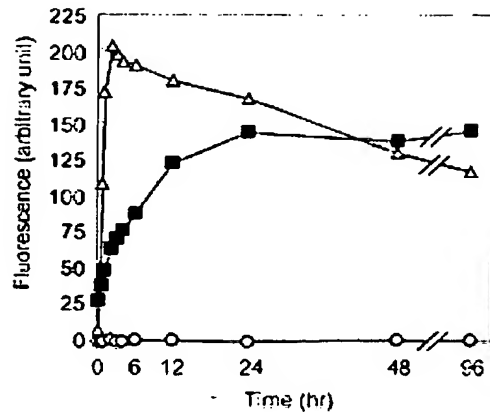


(B)

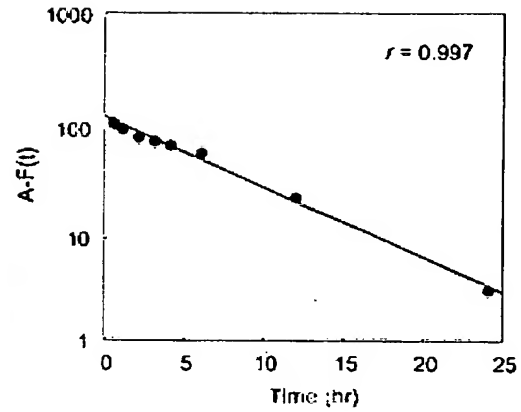


【図 4】

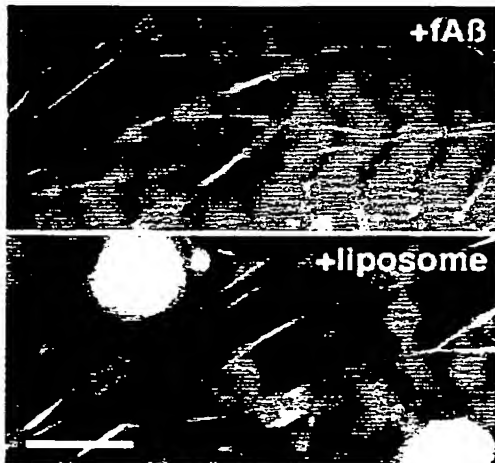
A



B

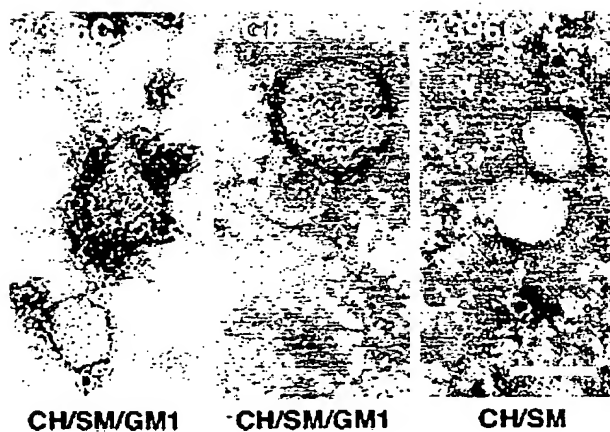


C

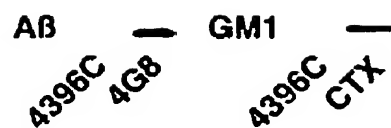


【図 5】

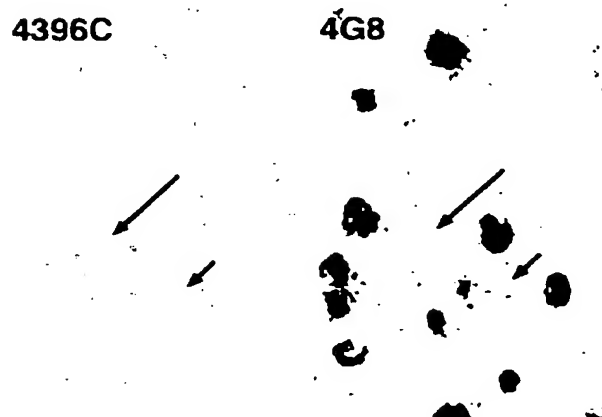
A



B

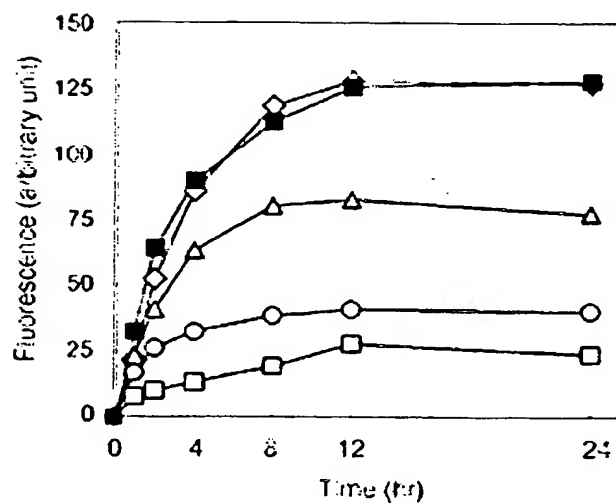


C

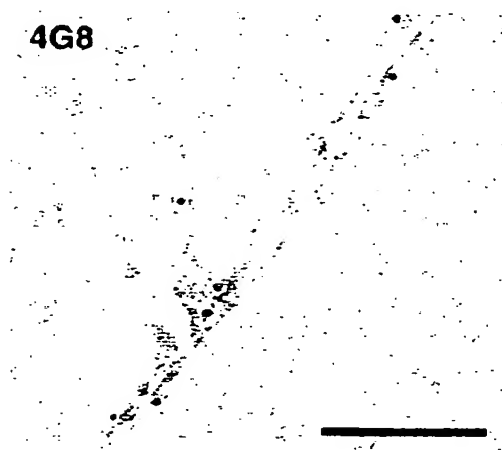


【図 6】

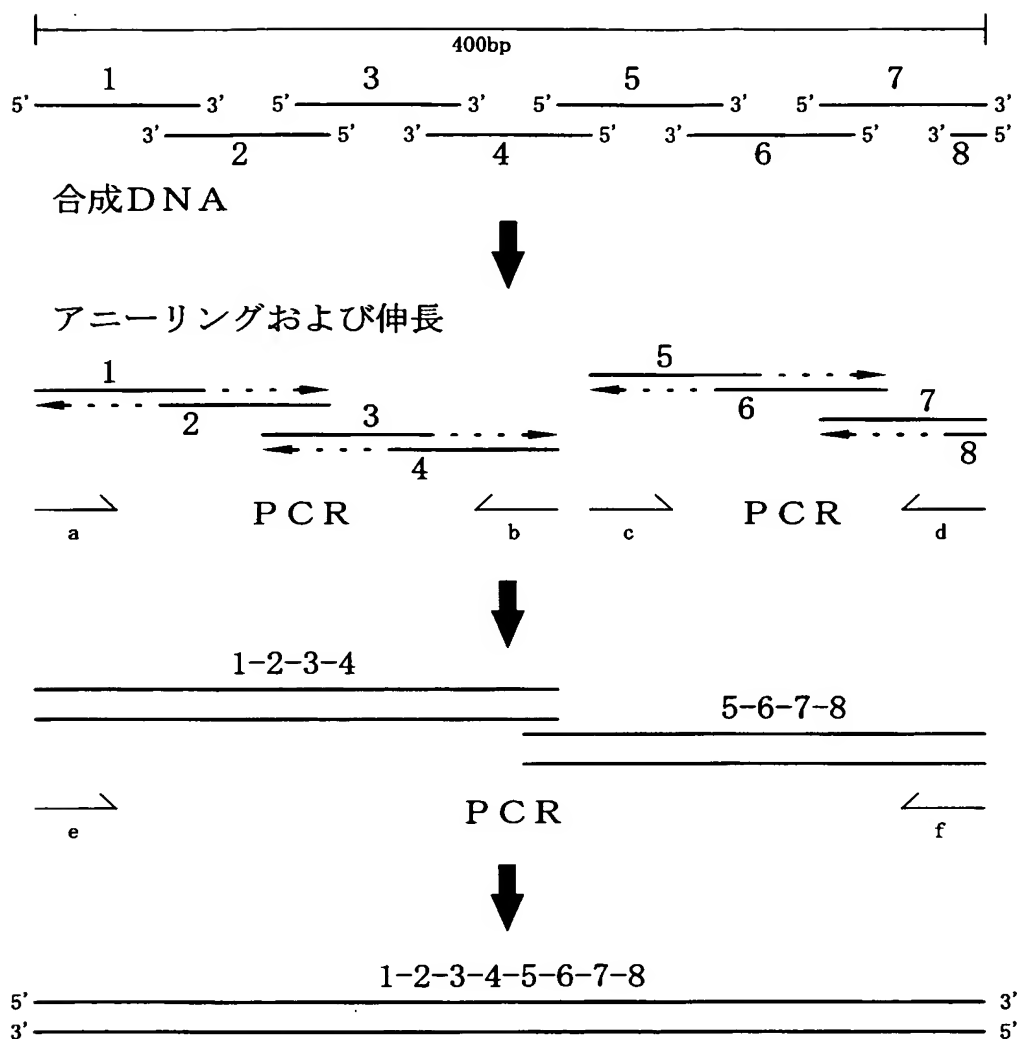
A



B



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アルツハイマー病の診断、予防、又は治療に有効な抗体及びこれをコードするDNA、並びに薬剤のスクリーニング方法、及び薬剤を提供する。

【解決手段】 アミロイド繊維形成初期に生ずるGM1ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を特異的に認識する抗体の可変領域のアミノ酸配列及び遺伝子配列を決定する。得られたアミノ酸配列及び遺伝子配列の情報を基に抗体をデザインする。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 1 - 2 3 5 7 0 0
受付番号	5 0 1 0 1 1 4 4 1 4 1
書類名	特許願
担当官	藤居 建次 1 4 0 9
作成日	平成 1 3 年 1 2 月 6 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成13年 8月 3日
【手数料の表示】	
【納付金額】	21,000円

次頁無

特願 2 0 0 1 - 2 3 5 7 0 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 0 0 0 4 0 9 7]

1. 変更年月日 1 9 9 8 年 7 月 2 2 日

[変更理由] 住所変更

住 所 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内
ビル5F

氏 名 株式会社医学生物学研究所

特願 2 0 0 1 - 2 3 5 7 0 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 3 0 4 3 1 9]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 7 月 3 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県大府市森岡町源吾 3 6 の 3
氏 名	国立療養所中部病院長

特願 2 0 0 1 - 2 3 5 7 0 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 3 0 8 6 4 9]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 8 月 3 日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県大府市森岡町源吾 3 6 - 3
氏 名	柳澤 勝彦